

Deteksi *Vibrio alginolyticus* patogenik dan nonpatogenik dengan metode *multiplex polymerase chain reaction* (multiplex PCR)



© BSN 2016

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Prakata	ii
Pendahuluan.....	iii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Istilah dan definisi	1
3 Prinsip umum.....	2
4 Peralatan	2
5 Bahan	2
6 Prosedur kerja	3
7 Pengamatan hasil dan dokumentasi.....	4
8 Interpretasi hasil	5
9 Jaminan mutu	5
Tabel 1. Komposisi bahan koktail PCR dengan <i>mastermix</i> komersial	4
Tabel 2 - Program amplifikasi	4
Tabel 3. Interpretasi hasil deteksi <i>V. alginolyticus</i> dengan multiplex PCR	5
Lampiran A_(informatif) Pembuatan larutan dan media	6
Lampiran B_(normatif) Hasil elektroforesis: deteksi <i>V. alginolyticus</i> dengan metode <i>multiplex</i> PCR	8
Bibliografi.....	9

Prakata

Standar Nasional Indonesia (SNI) Deteksi *Vibrio alginolyticus* patogenik dan nonpatogenik dengan metode *multiplex polymerase chain reaction* (*multiplex PCR*), ini menetapkan metode uji untuk dapat membedakan jenis *Vibrio alginolyticus* yang bersifat patogenik dengan yang tidak bersifat patogenik pada budidaya ikan.

Standar ini dirumuskan oleh Komite Teknis 65-07 Perikanan Budidaya dan telah dirumuskan melalui konsensus pada tanggal 15 November - 18 November 2015 di Bogor, yang dihadiri oleh anggota Komite Teknis 65-07, wakil-wakil dari pemerintah, produsen, konsumen, lembaga penelitian/pakar dan instansi terkait lainnya

Standar ini telah melalui jajak pendapat pada tanggal 1 Februari 2016 sampai dengan 30 Maret 2016 dengan hasil akhir disetujui menjadi RASNI.



Pendahuluan

Peraturan yang dijadikan rujukan di dalam penyusunan standar ini adalah

1. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No 28 tahun 2004 tentang Keamanan, Mutu dan Gizi Pangan.
2. Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. PER.19/Men/2010 tentang Pengendalian Sistem Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Pangan.
3. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.01/Men/2002 tentang Sistem Manajemen Mutu Terpadu Hasil Perikanan.
4. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.06/Men/2002 tentang Persyaratan dan Tata Cara Pemeriksaan Mutu Hasil Perikanan yang Masuk ke wilayah Republik Indonesia.
5. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. Kep.21/Men/2004 tentang Sistem Pengawasan dan Pengendalian Mutu Hasil Perikanan untuk Pasar Uni Eropa.
6. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. 26/Kepmen-KP/2013 tentang Penetapan Jenis-Jenis Hama dan Penyakit Ikan Karantina (HPIK), Golongan, Media Pembawa dan Penyebarannya.





Deteksi *Vibrio alginolyticus* patogenik dan nonpatogenik dengan metode *multiplex polymerase chain reaction (multiplex PCR)*

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan deteksi *Vibrio alginolyticus* patogenik dan nonpatogenik dari air dan/atau biota akuatik dengan metode *multiplex polymerase chain reaction (multiplex PCR)*.

2 Istilah dan definisi

Untuk tujuan penggunaan dalam dokumen ini, istilah dan definisi berikut digunakan :

2.1

amplifikasi

pelipatgandaan bagian tertentu dari *deoxyribonucleic acid* (DNA) dengan bantuan reaksi enzim *polymerase*

2.2

annealing

proses penempelan primer pada DNA untai tunggal yang komplementer

2.3

denaturasi

pemisahan DNA target dari untai ganda menjadi untai tunggal

2.4

DNA

materi genetik yang tersusun atas nukleotida dengan gula deoksiribosa, gugus fosfat, dan basa nitrogen (guanin, adenin, sitosin, timin)

2.5

ekstraksi

proses pemisahan materi genetik dari kultur bakteri atau jaringan contoh uji

2.6

ekstensi

proses pemanjangan primer dengan bantuan enzim DNA polimerase sehingga akan terbentuk DNA untai ganda

2.7

elektroforesis

proses pemisahan DNA hasil amplifikasi berdasarkan berat molekul dalam medan listrik

2.8

koktail

mastermix ditambah DNA *template*

2.9

multiplex PCR

Proses amplifikasi menggunakan lebih dari sepasang primer dan menghasilkan lebih dari satu target amplifikasi

2.9

template

DNA hasil ekstraksi yang digunakan sebagai cetakan untuk proses amplifikasi

2.10

Vibrio alginolyticus patogenik

bakteri penyebab penyakit pada biota akuatik, yang ditandai dengan septicemia dan ulser

2.11

biota akuatik

flora dan fauna yang terdapat di lingkungan perairan

3 Prinsip umum

Konfirmasi keberadaan *Vibrio alginolyticus* patogenik dan nonpatogenik dengan mengisolasi DNA dari kultur bakteri atau jaringan biota akuatik.

4 Peralatan

- a) autoklaf;
- b) alat dokumentasi gel;
- c) alat elektroforesis gel agarosa beserta *power supply*;
- d) bunsen;
- e) cawan petri;
- f) *freezer* (- 20 °C).
- g) jarum Ose;
- h) *laminar air flow cabinet*;
- i) *thermal cycler*;
- j) *microwave* atau *hot plate magnetic stirrer*;
- k) mikropipet berbagai ukuran 0,2 µl - 1 000 µl;
- l) *minimixer*;
- m) peralatan bedah terdiri dari pinset, gunting dan pisau bedah;
- n) penangas air (*waterbath*) atau *heating block*;
- o) sentrifus;
- p) timbangan analitik dengan ketelitian 0,1 mg;
- q) transiluminator UV.

5 Bahan

- a) agarosa;
- b) *nuclease free water* (NFW);
- c) 12,5x multiplex mastermix
- d) *TE buffer* (100 mM *tris*-HCl, 10 mM *ethylene diamine tetra acetyc acid* / EDTA);
- e) etanol absolut p.a;
- f) *lysis buffer*;
- g) 6x *loading dye*;

- h) DNA *marker*;
- i) mikrotip berbagai ukuran antara 10 µl – 1 000 µl;
- j) pewarna DNA;
- k) penggerus jaringan (*pellet pestle*);
- l) primer (Cai, *et al.* 2009):
 - Coll-F: 5'-TGG TGA ACA GCC AGT AAA-3' (10 µM);
 - Coll-R: 5'-CAA ACC CAT CAT AAG TAG TC-3' (10 µM);
 - ompK-F: 5'-GGC GGT CGC TCT GGT ATT-3' (10 µM);
 - ompK-R: 5'-TTG CCA TCG TAA GTG CTG TA-3' (10 µM);
 - toxR-F: 5'-CAG AAG AAT CGG AAG AAC A-3' (10 µM);
 - toxR-R: 5'-TAG AAT GAC GCA CAA AGG-3' (10 µM);
- m) 3 M sodium asetat (CH₃COONa) pH 5,2;
- n) tabung mikro ukuran 0,2 ml; 1,5 ml – 2,0 ml;
- o) *thiosulphate citrate bile-salt sucrose agar* (TCBSA).

CATATAN Pembuatan larutan dan media diuraikan pada Lampiran A.

6 Prosedur kerja

6.1 Preparasi contoh uji

Contoh uji berupa air dan/atau jaringan biota akuatik dengan atau tanpa melalui proses kultur.

6.2 Kultur bakteri dari contoh uji

- a) siapkan media TCBSA;
- b) inokulasikan contoh air atau gerusan jaringan biota akuatik secara aseptis pada media TCBSA;
- c) inkubasikan pada 28°C – 30°C selama 18 jam – 24 jam;

6.3 Ekstraksi DNA dengan *lysis buffer*

- a) masukkan 20 mg jaringan contoh uji ke dalam tabung mikro 1,5 ml;
- b) tambahkan 500 µl *lysis buffer* dan homogenkan;
- c) inkubasikan pada 95 °C selama 10 menit menggunakan *heating block* atau *waterbath*;
- d) sentrifugasi pada 12 000 x g selama 10 menit;
- e) pindahkan 200 µl supernatan ke dalam tabung mikro 1,5 ml baru yang telah diisi dengan 400 µl etanol absolut dan 20 µl sodium asetat;
- f) homogenkan, kemudian sentrifugasi pada 12 000 x g selama 5 menit;
- g) buang supernatan dan keringkan pelet;
- h) larutkan pelet dengan 100 µl – 200 µl akuabides atau bufer TE.

CATATAN 1 Contoh uji berupa koloni bakteri proses ekstraksi tidak perlu dilakukan tetapi dilarutkan ke dalam 10 µl akuabides

CATATAN 2 Prosedur ekstraksi DNA disesuaikan dengan kit komersial yang digunakan dan kompatibel dengan bahan amplifikasi yang sudah divalidasi

6.4 Amplifikasi

- a) cairkan (*thawing*) bahan *mastermix* PCR dan DNA *template*, letakkan di atas es.
- b) buat preparasi *mastermix* menggunakan campuran primer Coll-F, Coll-R, ompK-F, ompK-R, toxR-F dan toxR-R.

- c) siapkan volume *mastermix* 10% lebih banyak dari yang dibutuhkan hingga mencapai komposisi bahan koktail sesuai Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi bahan koktail PCR dengan *mastermix* komersial

Komposisi	Volume (μl)	Konsentrasi akhir
NFW	8,5	
2 x <i>mastermix</i>	12,5	1x
primer Coll-F, ompK-F, toxR-F (10 μM)	1,5	0,2 μM
primer Coll-R, ompK-R, toxR-R (10 μM)	1,5	0,2 μM
DNA <i>template</i> / kultur bakteri	1,0	10 ng - 100 ng
Total	25	

- d) homogenkan semua bahan *mastermix* dan distribusikan sebanyak 24 μl ke masing-masing tabung mikro 0,2 ml.
- e) tambahkan 1 μl DNA *template* contoh uji (10 ng -100 ng), sertakan contoh kontrol positif (DNA *Vibrio alginolyticus*) dan kontrol negatif (blanko/NFW).
- f) amplifikasi sesuai Tabel 2.

Tabel 2 - Program amplifikasi

Proses	Suhu (°C)	Waktu	Siklus
denaturasi awal	95	5 menit	1
	42	40 menit	
Amplifikasi	94	30 detik	30
	62	30 detik	
	72	60 detik	
Ekstensi akhir	72	10 menit	1

6.5 Elektroforesis

6.5.1. Persiapan

Contoh pembuatan bufer elektroforesis dan gel dapat dilihat pada Lampiran A.

6.5.2. Prosedur

- letakkan gel agarosa 1,5% ke *chamber* elektroforesis;
- tambahkan larutan 0,5x TBE ke dalam *chamber* elektroforesis hingga gel agarosa terendam;
- siapkan 2 μl *loading buffer* di atas parafilm sesuai jumlah contoh dan 1 *marker*;
- ambil contoh uji hasil PCR sebanyak 10 μl dan campur dengan *loading bufer*;
- masukkan ke dalam sumur (*well*) dengan menggunakan mikropipet disertakan juga *marker* DNA sebanyak 2 μl;
- masukkan contoh uji ke masing-masing sumuran kemudian pasang tutup elektroforesis *chamber* dan alirkan arus listrik dengan voltase 100 V -150 V;
- hentikan elektroforesis setelah pewarna biru-bromofenol mencapai 2/3 bagian panjang gel agarosa.

7 Pengamatan hasil dan dokumentasi

- angkat gel dari *chamber* setelah selesai proses elektroforesis;
- rendam gel dalam larutan zat pewarna DNA selama 10 menit.

- c) rendam gel dengan akuades selama 5 menit - 10 menit;
- d) amati dengan transiluminator UV dan dokumentasikan.

8 Interpretasi hasil

Berdasarkan pola pita pada gel agarosa yang diamati dengan transiluminator UV, maka interpretasi hasil deteksi *V. alginolyticus* dengan *multiplex* PCR ditampilkan pada Tabel 3.

Tabel 3. Interpretasi hasil deteksi *V. alginolyticus* dengan *multiplex* PCR

No	Kode	Ukuran pita (bp)	Interpretasi
1.	Kontrol negatif (blanko, NFW)	Tidak ada pita	
2.	Kontrol positif (DNA <i>V. alginolyticus</i> patogenik)	173, 319, dan 424	
3.	Contoh uji	173, 319, dan 424	terdeteksi <i>V. alginolyticus</i> patogenik
4.	Contoh uji	satu atau dua pita berukuran 173, 319 atau 424	terdeteksi <i>V. alginolyticus</i> nonpatogenik
5.	Contoh uji	Tidak ada pita berukuran 173, 319 dan 424	tidak terdeteksi <i>V. alginolyticus</i>

9 Jaminan mutu

- a) hasil ekstraksi DNA mempunyai A_{260}/A_{280} berkisar antara 1,8 – 2,1;
- b) proses amplifikasi dijamin kualitasnya dengan menyertakan kontrol positif dan kontrol negatif menunjukkan hasil yang konsisten.

**Lampiran A
(informatif)
Pembuatan larutan dan media**

A.1 Larutan 0,5 M Tris- HCl

Cara membuat :

- a) larutkan 121,1 g *Tris base* dalam 800 ml akuades;
- b) tambahkan 70 ml atau 42 ml HCl pekat untuk mendapatkan pH 7,4 atau 8,0;
- c) biarkan larutan dingin pada 25 °C – 30 °C sebelum pengaturan pH terakhir;
- d) tambahkan akuades hingga 1000 ml;
- e) alikuot dalam beberapa botol;
- f) sterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada 121 °C.

A.2 Larutan 5 M NaCl

Cara membuat:

- a) larutkan 292 g NaCl dalam 800 ml akuades;
- b) tambahkan akuades sampai 1 000 ml;
- c) alikuot dalam beberapa botol;
- d) sterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada 121 °C.

A.3 Larutan 2,5 M CaCl₂

Cara membuat:

- a) larutkan 11 g CaCl₂.6H₂O dalam akuades hingga volumenya 20 ml;
- b) saring larutan dengan filter 0,22 µm;
- c) alikuot 1 ml dan simpan pada 4 °C.

A.4 Larutan 10 mg/ml Proteinase K

Cara membuat:

- a) larutkan 100 mg proteinase K ke dalam larutan steril yang mengandung 50 mM Tris-HCl (pH 7,4) dan 5 mM CaCl₂ hingga volumenya 10 ml (campur 8880 µl akuades, 1 ml 0,5 M Tris-HCl pH 7,4 dan 20 µl 2,5 M CaCl₂);
- b) alikuot 1 ml dan simpan pada -20 °C.

A.5 Larutan 0,5 M *disodium ethylene diamine tetra acetate* (Na-EDTA) pH 8

Cara membuat:

- a) tambahkan 186,1 g Na-EDTA.2H₂O dalam 800 ml akuades.
- b) homogenkan dengan *magnetic stirrer*.
- c) tambahkan NaOH secara bertahap sambil dihomogenkan (±20 g NaOH pelet) hingga mencapai pH 8.
- d) tambahkan akuades sampai 1 000 ml;
- e) alikuot dan sterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada 121 °C.

A.6 Larutan 10 % *sodium dodecyl sulphate* (SDS)

Cara membuat :

- a) larutkan 100 g SDS *electrophoresis grade* ke dalam 900 ml akuades.
- b) panaskan pada 68 °C untuk melarutkan SDS.
- c) tambahkan beberapa tetes HCl pekat hingga mencapai pH 7,2.

- d) tambahkan akuades hingga 1 000 ml dan masukkan ke dalam botol reagen.
- e) aliquot dan sterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada 121 °C.

A.7 Larutan 0,5 µg/ml pewarna DNA

Cara membuat :

- a) tambahkan 5 µl larutan pewarna DNA 10 mg/ml ke dalam 100 ml bufer TBE.
- b) simpan di tempat yang gelap agar larutan pewarna DNA lebih awet .

A.8 Larutan 3 M sodium asetat pH 5,2

Cara membuat :

- a) larutkan 408,1 g CH₃COONa.3H₂O dalam 800 ml akuades.
- b) tambahkan asam asetat glasial hingga mencapai pH 5,2.
- c) tambahkan akuades sampai 1 000 ml.
- d) aliquot dan sterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada 121 °C.

A.9 5x TBE buffer dan 0,5x TBE buffer

Cara membuat 5x TBE buffer :

- a) masukkan 800 ml akuades ke dalam *beaker glass* berkapasitas 1 000 ml.
- b) masukkan 54 g *Tris base* dan 27,5 g asam borat ke dalam *beaker glass* yang telah berisi akuades dan aduk dengan *magnetic stirrer* sampai terlarut.
- c) tambahkan 20 mL 0,5 M EDTA, homogenkan.
- d) tambahkan akuades sampai 1 000 ml.
- e) aliquot dan sterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada 121 °C.

Cara membuat 0,5x TBE buffer:

campurkan 1 bagian 5x TBE buffer dengan 9 bagian akuades

A.10 Gel Agarose 1,5%

Cara membuat :

- a) larutkan 1,5 g agarosa dalam 100 ml 0,5 x TBE buffer.
- b) didihkan hingga larutan menjadi bening.
- c) tuang gel agarosa pada cetakan dengan sisir terpasang, setelah suhunya mencapai sekitar 60 °C.

A.11 Lysis buffer

Cara membuat :

- a) campurkan 69,7 ml akuades; 10 ml Tris-HCl 0,5 M (pH 8,0); 200 µl EDTA 0,5 M (pH 8,0); 10 ml NaCl 5 M; dan 10 ml SDS 10%.
- b) tambahkan 100 µl Proteinase K 10 mg/ml sesaat sebelum digunakan, untuk mendapatkan larutan dengan kadar akhir Tris-HCl 50 mM; EDTA 1 mM, NaCl 500 mM, SDS 1%, dan Proteinase K 10 µg/ml.

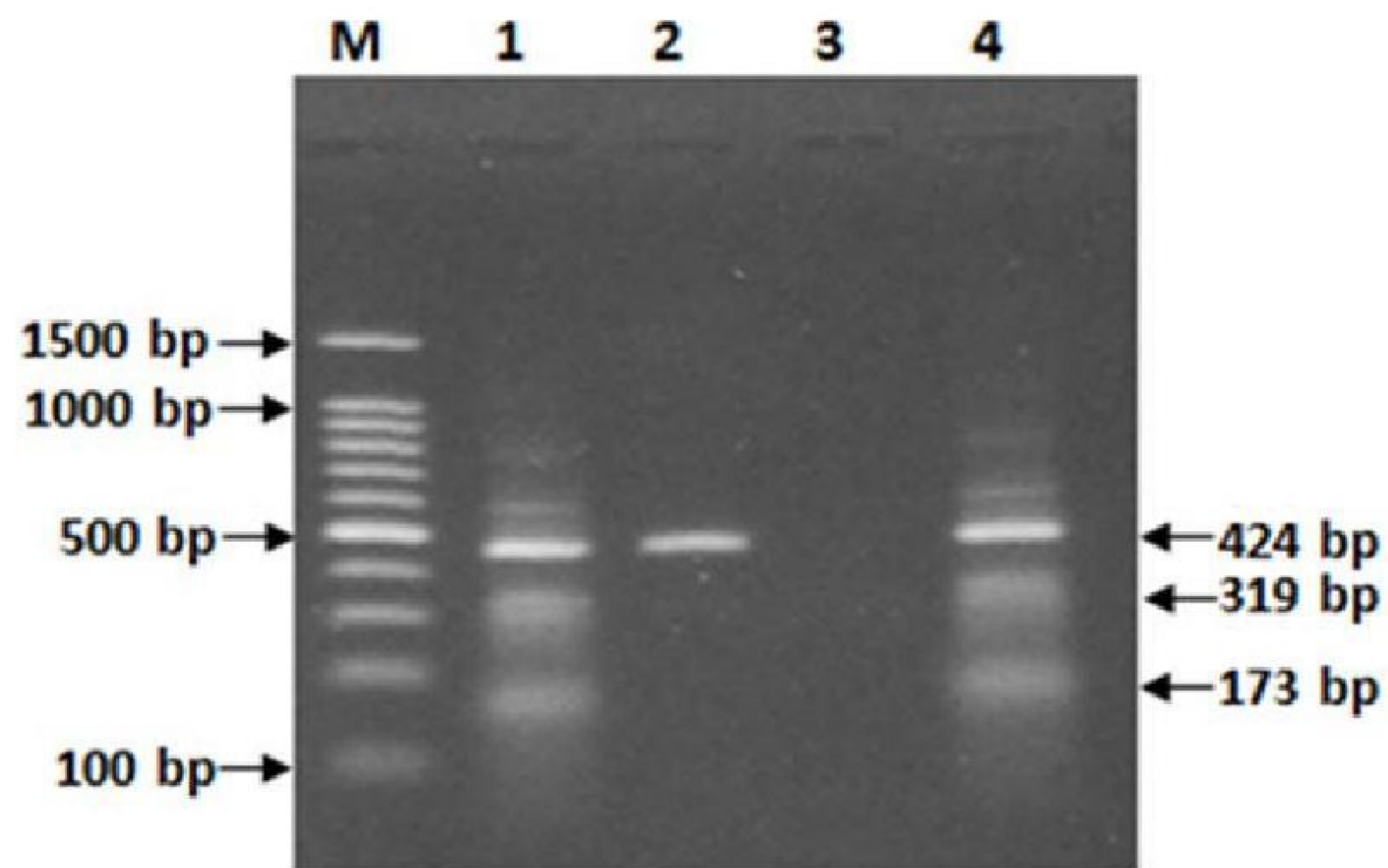
A.12 Thiosulphate citrate bile-salt sucrose agar (TCBSA)

Cara membuat :

- a) Larutkan 0,075 g KCl, 0,694 g MgSO₄, 1,84 g NaCl dan 88 g TCBSA dalam 1 000 ml akuades, kemudian didihkan.
- b) Tuang dalam cawan petri setelah suhunya mencapai sekitar 60 °C.

Lampiran B
(normatif)

Hasil elektroforesis: deteksi *V. alginolyticus* dengan metode *multiplex* PCR



Keterangan gambar:

- M: Marker
1 : Contoh uji terdeteksi *V. alginolyticus* patogenik
2 : Contoh uji terdeteksi *V. alginolyticus* nonpatogenik
3 : Kontrol negatif (blanko, NFW)
4 : Kontrol positif (DNA positif *V. alginolyticus* patogenik)

Bibliografi

Cai, S.H, Y.S Lu, Z.H Wu, J.C. Jian & Y.C. Huang, 2009. *A novel multiplex PCR method for detecting virulent strains of Vibrio alginolyticus*. Aquaculture Research 41: 27-34.

Sambrook, J. & D.W. Russel. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual Volume 3* CSHL Press. New York

